

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-133990

(43)Date of publication of application : 28.05.1996

(51)Int.Cl.

A61K 47/48
 A61K 9/16
 C08F220/36
 G01N 33/545
 // A61K 9/00
 A61K 39/385
 A61K 39/44
 A61K 49/00

(21)Application number : 06-276687

(71)Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22)Date of filing : 10.11.1994

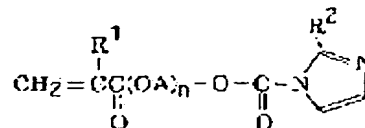
(72)Inventor : MIYAZAKI TAKESHI
 KOINUMA YASUYOSHI

(54) REACTIVE MICROSPHERE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a reactive microsphere, comprising a specific copolymer, excellent in dispersion stability in water or an organic medium, capable of readily and stably immobilizing a functional substance such as a protein and hardly causing the nonspecific adsorption of the protein, etc.

CONSTITUTION: This microsphere comprises a copolymer of a (poly)oxyalkylene derivative of the formula [OA is a 2-4C oxyalkylene; (n) is the average number of added mol of OA and is 1-1000; R¹ and R² are each H or CH₃] and a hydrophobic radically polymerizable monomer (preferably styrene). The microsphere is preferably obtained by polymerizing a compound of the formula with the radically polymerizable monomer in water or a mixed solvent of the water with ethanol in the presence of a radical polymerization initiator at 10-60° C for 1-24hr. Furthermore, the compound of the formula is obtained by reacting, e.g. a mono(meth)acrylic ester of a (poly)alkylene glycol with N,N'- carbonyldiimidazole.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-133990

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I
A61K 47/48	B	
9/16	E	
C08F220/36	MLZ	
G01N 33/545	Z	
// A61K 9/00	C	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全8頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-276687

(22) 出願日 平成6年(1994)11月10日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 鯉沼 康美

茨城県つくば市東新井32-16

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

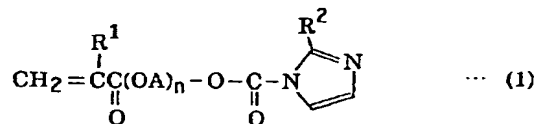
(54) 【発明の名称】 反応性マイクロスフェア

(57) 【要約】

【目的】 マイクロスフェア表面に機能性物質が共有結合により固定されたマイクロスフェアであって、水中での分散安定性に優れ、しかもタンパク質などの非特異的吸着が起こりにくい機能性物質固定化マイクロスフェアを得る。

【構成】 一般式(1)

【化1】

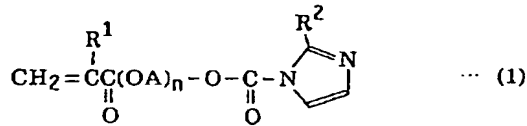


【OAはオキシアルキレン基、nは1~1000、R¹、R²は水素またはメチル基】の化合物とスチレンとを、有機溶媒と水との混合溶媒中で重合させ、コアにポリスチレンが集積し、シェルにポリオキシアルキレン鎖が集積した構造を有する反応性マイクロスフェアを得、次にこのマイクロスフェア表面上のオキシカルボニルイミダゾール基と機能性物質中のアミノ基とを反応させ、機能性物質を固定する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。オキシアルキレン基は1種のものも付加していても、2種以上のものが付加していてもよい。2種以上の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。R¹およびR²はそれぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。〕で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と、疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなることを特徴とする反応性マイクロスフェア。

【請求項2】 請求項1記載の反応性マイクロスフェアに機能性物質が固定されたことを特徴とする機能性物質固定化マイクロスフェア。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は(ポリ)オキシアルキレン誘導体をマクロモノマー成分とする反応性マイクロスフェア、およびこのマイクロスフェアに機能性物質が固定化された機能性物質固定化マイクロスフェアに関する。さらに詳しくは、診断薬、薬物運搬体、機能性塗料、機能性染料、機能性インクなどとして利用することができる反応性マイクロスフェアおよび機能性物質固定化マイクロスフェアに関する。

【0002】

【従来の技術】塗料または診断薬の分野においては、ポリスチレンからなるラテックスまたはマイクロスフェアが広く用いられている。しかし、ポリスチレンのみからなるラテックスまたはマイクロスフェアは、溶液中、特に水中での分散安定性が悪くて沈降しやすいため、これらを水系媒体中で単独で使用することは難しく、界面活性剤などとの併用が必要である。また、特に診断薬用の担体としてポリスチレンラテックスを用いる場合、ポリスチレンラテックス中にはタンパク質と反応する官能基が存在していないので、抗体の担持方法は吸着平衡によるものとなり、このため吸着担持される抗体量が制限されたり、あるいは吸着担持した抗体が脱離しやすいという問題点がある。さらに、検体中に共存する他のタンパク質などが非特異的に吸着し、検出感度や信頼性を低下させるなどの問題点もある。

【0003】このためスチレンなどと共重合させることにより、得られるポリスチレンラテックスまたはマイクロスフェアに水分散安定性を付与することができるモノマー、あるいは診断薬用高分子のモノマーとして使用

することにより、タンパク質などの機能性物質と容易に共有結合する官能基を有するモノマーが要望されているが、このような要望を十分に満足させる化合物は知られていない。従って、塗料または診断薬の分野における要望を十分に満足させるような水中での分散安定性に優れたマイクロスフェアは得られていない。またマイクロスフェア表面にタンパク質などの機能性物質を化学結合により容易に固定化することができるマイクロスフェアも得られていない。

【0004】ところで特開昭57-92332号には、片末端に重合性二重結合、他方の片末端に官能基を有するポリオキシアルキレン誘導体が開示され、感光性樹脂組成物のモノマー成分として利用されている。しかし、この化合物を、タンパク質等の機能性物質固定用の高分子を製造するためのマクロモノマーとして利用することは示唆されていない。

【0005】

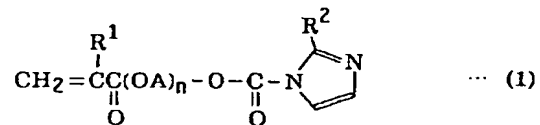
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、水または有機媒体中での分散安定性に優れ、しかもタンパク質などの機能性物質を容易に化学結合により安定に固定化することが可能で、かつタンパク質などの非特異的吸着が起こりにくい反応性マイクロスフェアを提供することである。本発明の他の目的は、上記反応性マイクロスフェアにタンパク質などの機能性物質が化学結合により固定されたマイクロスフェアであって、固定化された物質の脱離が起らず、しかも固定化された物質の活性が十分に発揮される機能性物質固定化マイクロスフェアを提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は次の反応性マイクロスフェア、この反応性マイクロスフェアに機能性物質が固定化された機能性物質固定化マイクロスフェアである。

【0007】(1)一般式(1)

【化2】



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。オキシアルキレン基は1種のものも付加していても、2種以上のものが付加していてもよい。2種以上の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。R¹およびR²はそれぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。〕で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と、疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなることを特徴とする反応性マイクロスフェア。

(2)上記(1)記載の反応性マイクロスフェアに機

能性物質が固定されたことを特徴とする機能性物質固定化マイクロスフェア。

【0008】本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」はオキシアルキレンまたはポリオキシアルキレンを意味する。一般式(1)のOAで表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2~4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0009】一般式(1)のnは1~1000、好ましくは2~500、さらに好ましくは5~300の正数である。nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のものでも、異なるものでもよい。後者の場合、ランダムに付加していても、ブロック状に付加していてもよい。親水性を付与する場合、OAとしてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合nが3以上のものが好ましい。また種類の異なるオキシアルキレンが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。(ポリ)オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0010】オキシアルキレン基の種類の異なるものとしては、例えばオキシエチレン基とオキシプロピレン基とがランダムに付加したもの、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンのようにブロック状に付加したもの、またはポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレン

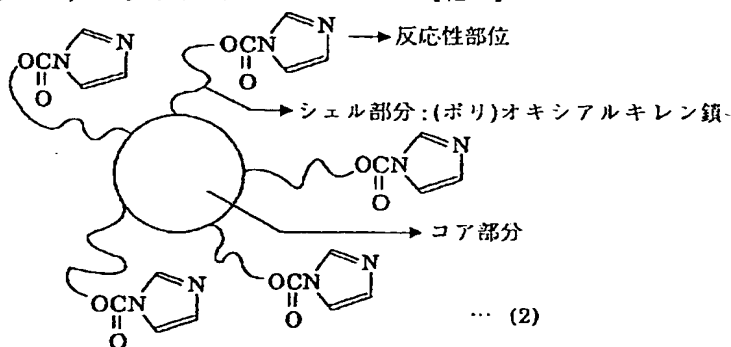
ノポリオキシエチレンのようにブロック状に付加したものなどがあげられる。

【0011】一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体は、例えば(ポリ)アルキレングリコールのモノメタクリル酸エステルまたはモノアクリル酸エステル、具体的には α -メタクリロイル- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン)などと、N, N'-カルボニルジイミダゾールとを、無溶媒であるいはベンゼン、トルエン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサンなどの有機溶媒中で、-100~+150℃、好ましくは0~100℃で、10分間~100時間、好ましくは1~4時間反応させることにより容易に製造することができる。反応終了後は、抽出、蒸留、再結晶、再沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により、容易に単離・精製することができる。

【0012】本発明の反応性マイクロスフェアは一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなるものであり、コアに共重合体の主鎖が集積し、シェルに共重合体の側鎖である(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積した構造を有する粒子であって、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に、アミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基、特に第1級アミノ基に対して高い反応活性を有するオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基が存在している。反応性マイクロスフェアの粒径は特に限定されないが、平均粒径1~1000nm、好ましくは100~500nmのものが望ましい。

【0013】本発明の反応性マイクロスフェアを模式的に示すと次式(2)のように表すことができる。

【化3】



【0014】本発明の反応性マイクロスフェアに親水性を付与する場合、一般式(1)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体としてはOAがエチレンオキシドの単独付加であるものを使用するのが好ましく、特にnが3以上のものを使用するのが好ましい。オキシアルキレン基の種類が異なる場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているポリオキシアルキレン誘導体を使用するのが望ましい。この

ようなポリオキシアルキレン誘導体を用いることにより、前記式(2)に示したように、親水性のポリオキシアルキレン鎖がマイクロスフェアの表面に集積するので、水分散安定性に優れたマイクロスフェアが得られる。またこのような反応性マイクロスフェアは、ポリオキシエチレン鎖またはオキシエチレン基の付加モル数の多いポリオキシアルキレン鎖が両親媒性を示すので、酢酸エチル、エタノール、メタノール、プロパノール、

ブタノールなどの有機溶媒中においても分散安定性に優れている。反応性マイクロスフェアに親油性を付与する場合、エチレンオキシド以外のアルキレンオキシドの付加モル数が多い(ポリ)オキシアルキレン誘導体を使用する。

【0015】前記疎水性のラジカル重合性単量体としては、一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体とラジカル重合可能な疎水性の単量体を使用でき、例えばスチレン、p-クロロスチレン、m-クロロスチレン、p-プロモスチレン、m-プロモスチレン、p-メチルスチレン、m-メチルスチレン、p-エチルスチレン、m-エチルスチレン、p-ジビニルベンゼン、m-ジビニルベンゼン等のスチレン誘導体；ベンジル(メタ)アクリレート、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート等のアクリル誘導体；酢酸ビニル、安息香酸ビニル等のビニルエステル誘導体などがあげられる。これらの中ではスチレン誘導体、特に比重が小さく生成する反応性マイクロスフェアの水分散液状態での安定性に特に優れるという理由からスチレンが好ましい。

【0016】本発明の反応性マイクロスフェアは、一般式(1)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体とを、水および水と混合可能な有機溶媒の混合溶媒中でラジカル重合させることにより製造することができる。上記有機溶媒としては、メタノール、エタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセタミドなどが好ましく使用できる。これらの中では、特にエタノールが好ましい。有機溶媒と水との混合割合は、有機溶媒：水の体積比で5：95～99：1(5～99体積%)、好ましくは50：50～95：5(50～95体積%)とするのが望ましい。反応溶媒として水単独または有機溶媒単独で用いても、反応性マイクロスフェアは形成されない。

【0017】一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体とラジカル重合性単量体との配合割合は、(ポリ)オキシアルキレン誘導体：単量体のモル比で0.01：99.9～50：50、好ましくは0.5：99.5～30：70とするのが望ましい。上記範囲外になると反応性マイクロスフェアが形成されにくくなる。混合溶媒中の総モノマー濃度は0.001～100mol/l、好ましくは0.1～10mol/lとするのが望ましい。この範囲外になると反応性マイクロスフェアが形成されにくくなる。

【0018】反応はラジカル重合開始剤の存在下に行うのが好ましい。ラジカル重合開始剤としては、10時間半減期温度が10～150℃の過酸化物質またはアゾ系化合物が好ましい。例えば、過硫酸アンモニウム等の無機過酸化物質；過酸化ベンゾイル、t-ブチルヒドロペルオ

キシド、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、t-ブチルペルオキシ(2-エチルヘキサノエート)等の有機過酸化物質；2,2'-アゾビス[2-(5-メチル-2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)等のアゾ系化合物などがあげられる。ラジカル重合開始剤の使用割合は、総モノマーモル数に対して0.001～10mol%、好ましくは0.1～5mol%とするのが望ましい。

【0019】重合反応は、脱気封管中で、または窒素、アルゴン、二酸化炭素などの不活性ガス雰囲気下で、反応温度0～150℃、好ましくは10～60℃、反応時間30分間～100時間、好ましくは1～24時間の条件で行うことができる。

20 【0020】また別の方法として、紫外線、電子線、γ線などの照射による光・放射線重合法などの方法によっても同様に反応性マイクロスフェアを得ることができる。このようにして、重合時のモノマー濃度、溶媒組成、モノマー組成などの諸条件を選択することにより、平均粒径1～1000nm、CV値5～30%程度の単分散性に優れた反応性マイクロスフェアを得ることができる。得られた反応性マイクロスフェアはそのまま、あるいは遠心分離、沈降分離、透析、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により精製した後、使用することができる。

30 【0021】本発明の反応性マイクロスフェアは前記式(2)に示されているように、コアに主鎖部分が集積し、シェルに(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積した構造のものであり、水や有機溶媒中での分散安定性に優れている。さらに、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に反応性に優れたオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基が存在し、この基が機能性物質固定用のリガンドとなるため、種々の機能性物質を化学的結合により固定化することが可能である。このため、機能性物質を固定する基材(担体)として好適に使用することができる。またその他にも、コア部に染料や顔料を滲透させて機能性染料として使用できるほか、機能性インク、機能性塗料などとしても使用することもできる。

40 【0022】本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、前記反応性マイクロスフェアに機能性物質が化学結合(共有結合)により固定されたマイクロスフェアである。固定化する機能性物質は特に限定されないが、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、電極感受性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等

の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、抗原、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬などがあげられる。これらの中では、分子中にアミノ基、水酸基またはチオール基を有するものが好ましく、特にオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基と容易に反応する第1級アミノ基を有するものが好ましい。

【0023】上記抗体の具体的なものとしては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、これらの一部ユニットなどがあげられる。これらの抗体はヒト、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリなど、いかなる動物種由来のものであっても、またいかなるハイブリドーマに由来するものであってもよい。また上記抗原の具体的なものとしては、タンパク質、オリゴ糖、高分子糖、低分子ハプテン、コレステロールなどがあげられる。ただしハプテンの場合には、固定化のために、その分子内にアミノ基、水酸基またはチオール基のいずれかの官能基を有することが必要である。このような抗体または抗原が固定化されたマイクロスフェアは、診断薬として好適に利用される。

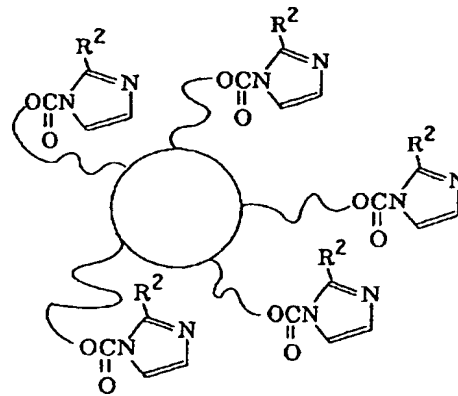
【0024】機能性物質の固定化は反応性マイクロスフェアのオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基と、機能性物質のアミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基との間で、アミド結合、エステル結合またはチオールエステル結合などの共有結合を形成することにより行われる。本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、前記反応性マイクロスフェアと機能性物質とを接触させることにより容易に製造することができる。接触方法としては、反応性マイクロスフェアの懸濁液に機能性物質を添加して攪拌する方法などが採用できる。

【0025】本発明の反応性マイクロスフェアへの機能性物質の固定化は、反応溶媒中で反応性マイクロスフェアと機能性物質とを反応させることにより行うことができる。反応溶媒としては、水、生理的食塩水、または $\text{pH}=5\sim 12$ 、好ましくは $7\sim 11$ のリン酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の緩衝液；エタノール、メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒；これらの有機溶媒と水、生理的食塩水または前記緩衝液との混合溶媒などを使用することができる。

【0026】反応溶液中の反応性マイクロスフェアの濃度は、 $0.001\sim 50$ 重量%、好ましくは $0.01\sim 30$ 重量%、機能性物質の濃度は $1\text{nmol/l}\sim 1\text{mol/l}$ 、好ましくは $1\mu\text{mol/l}\sim 100\text{mmol/l}$ とするのが望ましい。反応温度は $0\sim 100^\circ\text{C}$ 、好ましくはアミノ基との反応の場合は $25\sim 60^\circ\text{C}$ 、水酸基またはチオール基との反応の場合は $30\sim 80^\circ\text{C}$ 、反応時間は10分間 ~ 200 時間、好ましくは1分間 ~ 48 時間とするのが望ましい。このような条件の範囲外になるとマイクロスフェアの安定性が悪くなる傾向にある。機能性物質を固定したマイクロスフェアを診断薬として利用する場合は、反応性マイクロスフェアとしては平均粒径が $100\sim 500\text{nm}$ のものを使用するのが好ましい。

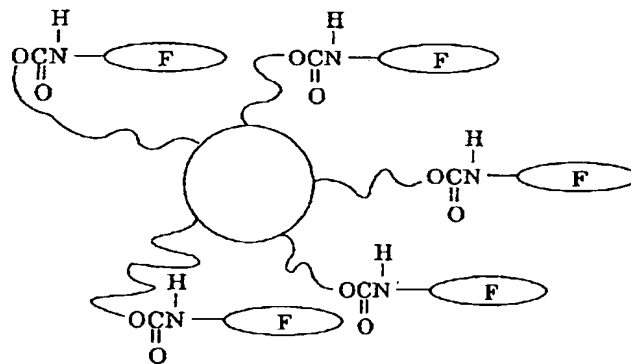
【0027】反応性マイクロスフェアとアミノ基を有する機能性物質との固定化反応を模式的に示すと次式(3)のようになる。

【化4】



反応性マイクロスフェア

$\text{H}_2\text{N}-\text{F}$; 機能性物質



機能性物質固定化マイクロスフェア

(3)

【0028】反応終了後の混合物は、遠心分離、沈降分離、ゲルろ過、限外ろ過、透析、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により精製することができる。このようにして得られた機能性物質固定化マイクロスフェアは、機能性物質が共有結合により固定されているので、機能性物質の脱離は起こらず、安定に固定化されたものとなる。また表面に(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積しているのでタンパク質などの非特異的な吸着も起こりにくく、このため機能性物質固定化マイクロスフェアを診断薬として用いた場合でも、検出感度や信頼性の高いものとなる。さらに固定化された機能性物質の活性も十分に発揮される。本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、診断薬の他にも固定化酵素、薬物運搬体などとしても利用することができる。

【0029】

【発明の効果】本発明の反応性マイクロスフェアは、一般式(1)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体から構成されているので、水または有機溶媒中での分散安定性

に優れるとともに、機能性物質を容易に化学結合により安定に固定化することができる。また反応性マイクロスフェアにはタンパク質などの非特異的な吸着が起こりにくい。

【0030】本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、上記反応性マイクロスフェアに機能性物質が化学結合により固定されているので、機能性物質の脱離は起こらず、しかも固定化された機能性物質の活性が十分に発揮される。

【0031】

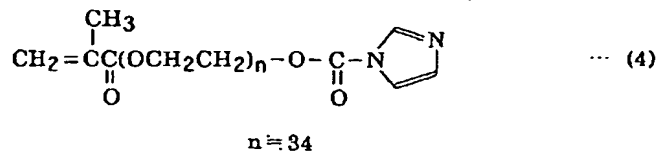
【実施例】以下、実施例により、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

合成例1

ベンゼン中、 α -メタクリロイル- ω -ヒドロキシポリオキシエチレン($n=7, 6$) 10.00g (23.8 mmol) およびN, N'-カルボニルジイミダゾール 3.86g (26.2 mmol) を混合し、室温で24時間攪拌した。これを蒸留水20mlで3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後凍結乾燥し、白色粉末状

の下式(4)のポリオキシアルキレン誘導体を得た。

【化5】



【0032】実施例1-1

溶媒となる80%エタノール水溶液(水:エタノール=2:8(v/v))5mlに、重合開始剤として2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン] 2.5mg(100 μ mol;全モノマーに対して1.5mol%)、合成例1で得たポリオキシアルキレン誘導体0.57mmol、およびスチレン2.88mmolを仕込み、脱気封管中、60℃で48時間緩やかに振盪させながら重合を行った。その後、大量の蒸留水中にて48時間透析し、反応性マイクロスフェア一分散液を得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径をCOULTER N4型サブミクロン粒子分析計を用いて測定した。平均粒径およびCV値を表1に示す。

す。

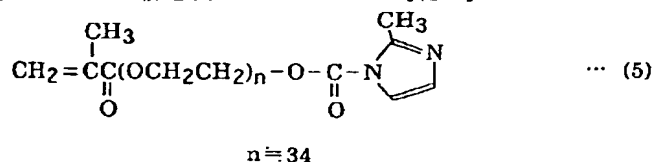
【0033】実施例1-2~1-5

実施例1-1と同様にして、ただし表1の通りモノマー配合を種々変えて、反応性マイクロスフェアを得た。なお、各実施例とも重合開始剤は全モノマーに対して1.5mol%になる量で用いた。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

【0034】実施例1-6

実施例1-1と同様にして、ただし下式(5)のポリオキシアルキレン誘導体を用いて反応性マイクロスフェアを得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

【化6】

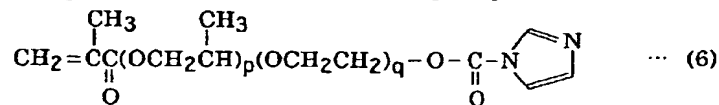


【0035】実施例1-7

実施例1-1と同様にして、ただし下式(6)のポリオキシアルキレン誘導体を用いて反応性マイクロスフェア

一を得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

【化7】



$p \approx 5$ 、 $q \approx 30$ (ブロック共重合体)

【0036】

【表1】

表1

	(ポリ)オキシアルキレン誘導体 (mmol)	ラジカル重合性 単量体 (mmol)	平均粒径 (nm)	CV値 (%)
実施例1-1	0.57	スチレン 2.88	106	15
実施例1-2	0.57	スチレン 5.76	114	17
実施例1-3	0.57	スチレン 8.64	122	23
実施例1-4	0.57	p-クロロスチレン 2.88	178	28
実施例1-5	0.57	p-ブロモスチレン 2.88	238	29
実施例1-6	0.57	スチレン 2.88	111	16
実施例1-7	0.57	スチレン 2.88	201	21

【0037】実施例2-1

50 実施例1-1で得られた反応性マイクロスフェアをリ

ン酸緩衝液(0.1M、pH=7.4)を用いて固形分量2wt%に調製し、この5mlに、20mg/mlの牛血清アルブミン(以下、BSAと略す)0.1Mリン酸緩衝液(pH=9.0)3mlを加え、4℃で24時間インキュベートした。反応終了後、遠心分離(4000rpm、10分間)、上澄みを0.1Mリン酸緩衝液(pH=7.4)で置換する操作を3回繰り返すことにより精製を行い、BSA固定化マイクロスフェアーを得た。

【0038】得られたBSA固定化マイクロスフェアーのBSA固定化量を、ニンヒドリン法を用いて定量した。すなわち、ニンヒドリン400mg、ヒドリンダンチン60mgをメチルセロソルブ15mlに溶解した後、酢酸ナトリウム緩衝液(pH=5.5)5mlを加えることによりニンヒドリン溶液を調製した。一方、上記により得られたBSA固定化マイクロスフェアー分散液1mlに4N塩酸を1ml加え、100℃で2時間処理した後、さらに4N水酸化ナトリウム溶液により中和し、蒸留水にて正確に5mlに調整した。さらに遠心分離(4000rpm、10分間)を行い、上澄み3mlを計り取り、これに上記ニンヒドリン溶液1mlを加え、100℃で20分間インキュベートした。水冷した後、分光光度計にて570nmの吸光度を測定し、あらかじめ同様の操作で求めた検量線よりBSA固定化量を算出した結果、25.8μg/mlであった。

【0039】比較例1

実施例1-1と同様にして、ただし式(4)のポリオキシアルキレン誘導体の代わりにα-メタクリル-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量3000)を用いて、マイクロスフェアー分散液を調製し、さらに実施例2-1と同様にしてBSAを接触させた。このマイクロスフェアーについて実施例2-1と同様にしてニンヒドリン法を試みたが、BSA固定化量は0μg/mlであり、BSAはマイクロスフェアーに固定化されていないことが確認された。

【0040】実施例2-2

実施例2-1と同様にして、ただしBSAの代わりに1mg/mlの西洋山葵ペルオキシダーゼ(以下HRPと略す)0.1Mリン酸緩衝液(pH9.0)3mlを用いて、HRP固定化マイクロスフェアーを得た。次に

得られたHRP固定化マイクロスフェアーのHRP固定化の確認を、HRPの酵素活性による発色法により確認した。すなわち、得られたHRP固定化マイクロスフェアー分散液500μlに、HRPの基質である1,2-フェニレンジアミン溶液(10mmol/l)100μlを加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10μlを加えたところ、褐色の呈色が見られ、HRPの固定化が確認された。

【0041】比較例2

実施例1-1と同様にして、ただし式(4)のポリオキシアルキレン誘導体の代わりにα-メタクリル-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量3000)を用いて、マイクロスフェアー分散液を調製し、さらに実施例2-2と同様にしてHRPを接触させた。このマイクロスフェアーについて実施例2-2と同様にして発色法を試みたが、発色はみられず、HRPはマイクロスフェアーに固定化されていないことが確認された。

【0042】実施例2-3

実施例2-1と同様にして、ただしBSAの代わりに10mg/mlの抗ヒトヘモグロビン-ヤギIgG/0.1Mリン酸緩衝液(pH9.0)3mlを用いて、抗体固定化マイクロスフェアーを得た。次に得られた抗体固定化マイクロスフェアーの抗体の固定化の確認を、抗原抗体反応に基づく凝集反応の有無により検定した。すなわち、得られた抗体固定化マイクロスフェアー分散液500μlを、500μg/mlのヒトヘモグロビン-生理的食塩水1ml中に加え、37℃で10分間インキュベートしたところ、反応器の底に凝集物がみられ、抗体がマイクロスフェアーに固定化されていることが確認された。

【0043】比較例3

実施例1-1と同様にして、ただし式(4)のポリオキシアルキレン誘導体の代わりにα-メタクリル-ω-メチルポリオキシエチレン(分子量3000)を用いて、マイクロスフェアー分散液を調製し、さらに実施例2-3と同様にして抗体を接触させた。このマイクロスフェアーの凝集反応を試みたが、凝集はみられず、抗体はマイクロスフェアーに固定化されていないことが確認された。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

A61K 9/00
39/385
39/44
49/00

識別記号

庁内整理番号

F

F I

技術表示箇所

A

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.